Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

DIE FIBRINOLYTISCHEN EIGENSCHAFTEN VON LEUKOZYTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
GERHARD MAIER
aus Stetten i. R.

1978

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

DIE FIBRINOLYTISCHEN EIGENSCHAFTEN VON LEUKOZYTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
GERHARD MAIER
aus Stetten i. R.

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan : Professor Dr. H.-E. Hoffmeister

Berichterstatter : Priv.-Doz. Dr. E. Hiller
(Professor Dr. H. D. Waller)

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	EINLEITUNG	1
II	FIBRINOLYSE	4
III	PROBLEMSTELLUNG	6
IV	MATERIAL UND METHODEN	7
	1a Lösungen zur Leukozytenisolierung	7
	1b Lösungen und Reagenzien zur Fibrinplatten-herstellung	8
	1c Kulturmedium	8
	1d Endotoxin	8
	1e Trypanblaulösung	9
	1f Lösungen zur Proteinbestimmung nach Lowry	9
	2 Anreicherung der Leukozyten	9
	3 Inkubation der Leukozyten	10
	4 Proteinbestimmung nach Lowry	11
	5 Herstellung der Fibrinplatten	12
V	ERGEBNISSE	13
	1a Gemischte Leukozyten von Gesunden auf Fibrin-platten	13
	1b Fibrinolyse nach Zugabe von Antifibrinolytika	15
	2 Fibrinolytische Aktivität gemischter Leukozyten nach Endotoxinstimulierung	19
	3a Fibrinolytische Aktivität von isolierten Granulozyten	24
	3b Fibrinolytische Aktivität von isolierten Mono-	26

Seite

zyten

3c Fibrinolytische Aktivität von isolierten Lymphozyten 27

4 Fibrinolytische Aktivität von Myeloblasten bei akuter Leukämie 29

5 Fibrinolytische Aktivität von Lymphoblasten und Lymphozyten bei chronisch lymphatischer Leukämie 29

6 Fibrinolytische Aktivität von Leukozyten von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie 30

VI D I S K U S S I O N 34

VII Z U S A M M E N F A S S U N G 38

VIII L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 39

L E B E N S L A U F

I : E I N L E I T U N G

Während der letzten Jahrzehnte wurden von einer Reihe von Autoren proteolytische Enzyme in menschlichen Leukozyten beschrieben.

OPIE (1905) war der erste, der in den Zellen eines entzündlichen Exsudates zwei proteolytische Enzyme nachweisen konnte, wovon das eine im neutralen bis leicht alkalischen pH - Bereich wirkt und das andere im sauren pH. HUSFELDT (1931) beschrieb bei Patienten mit myeloischer Leukämie zwei Proteasen in weißen Blutzellen : "Kathepsin" (Protease) mit Wirkungsoptimum bei pH 3 - 7 und eine stark wirkende "Tryptase" im alkalischen Bereich. BARNES (1940) berichtete dann, daß Kaninchenleukozyten ein trypsinähnliches "Kathepsin" (Protease) mit einem Wirkungsoptimum bei pH 8 enthalten. Dagegen fanden COHN und HIRSCH (1960) keine "Leukoprotease" in Kaninchenleukozyten.

FRÄNKEL - CONRATH und CHEW (1960) entdeckten in Normalleukozyten und leukämischen Leukozyten eine Protease, die im sauren pH denaturiertes Hämoglobin angreift. MOUNTER und ATIYEH (1960) wiesen eine proteolytische Aktivität in ultraschallbehandelten menschlichen Leukozytensuspensionen nach. Sie fanden drei Proteasen, die jeweils bei pH 3, 5,5 und 8 ihr Wirkungsoptimum entwickelten, wobei die bei pH 3 und 5,5 wirkenden Proteasen aus den Lymphozyten stammten und die bei pH 8 wirkende in den polymorphkernigen Leukozyten enthalten war. CAVIEZEL, VOLLERY und VANOTTI (1964) wiesen mit fluoreszierendem Fibrin als Substrat eine fibrinolytische Aktivität in menschlichen Leukozyten nach. In den folgenden Jahren wurde nun untersucht, ob neben der "unspezifisch - proteolytischen"

noch eine "spezifisch - plasminbedingte" Aktivität existiert und in welcher Zellfraktion sie lokalisiert ist. JÜRGENS (1963), BACIU (1965) und SABA ET AL. (1969) zeigten, daß in menschlichen Leukozyten neben der unspezifischen Protease ein Plasminogenaktivator enthalten ist. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten KOPITAR und STEGNAR (1974) bei der Untersuchung von Schweineleukozyten nach der Astrup -Fibrinplatten - Methode. BARNHARDT und RIDDLE (1963), PROKOPOWICZ (1968) und MITSUOKA ET AL. (1969) postulierten, daß Leukozyten zusätzlich noch Plasminogen enthalten. OHLSSON (1971) jedoch verneinte das Vorkommen von Plasminogen in Leukozyten. ASTRUP ET AL. (1967) schließlich lehnten jede leukozytäre Plasminogenaktivator - Aktivität ab.

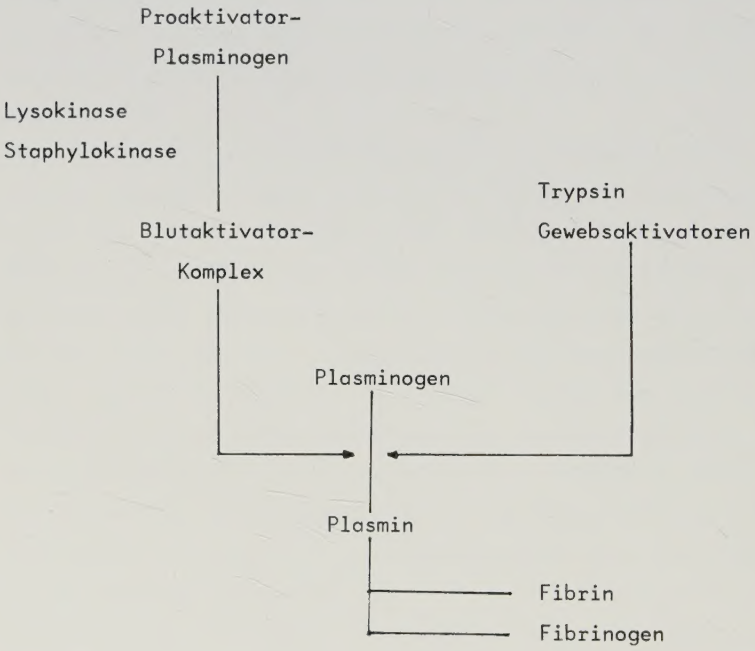
Über die proteolytische und fibrinolytische Aktivität leukämischer Leukozyten liegen widersprüchliche Untersuchungsergebnisse vor. FRÄNKEL - CONRATH (1960), YOUNG und PRAGER (1962), PROKOPOWICZ und STORMORKEN (1968), MATSUOKA ET AL. (1969) und WATANABE (1970) fanden eine größere fibrinolytische Aktivität bei den Zellen der myeloischen Reihe als bei der lymphatischen Reihe. HIRSCH und BUCHANAN (1967) fanden dagegen bei drei untersuchten Fällen von akuter myeloischer Leukämie keinerlei fibrinolytische Aktivität. PROKOPOWICZ und STORMORKEN (1968) konnten mit der Untersuchungsmethode nach TODD (1959) bei Myeloblasten sowie Lymphozyten und Lymphoblasten keine fibrinolytische Aktivität nachweisen.

Die Technik der Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität geht auf ASTRUP und MÜLLERTZ (1952) zurück. Sie bestimmten die fibrinolytische Aktivität, indem sie Gewebs- oder zelluläre Bestandteile auf einen Fibrinfilm von definierter Dicke und Konzentration aufbrachten und die Durchmesser der lysierten Zone bestimmten. Da ihr verwendetes Fibrinogen mit Plasminogen ver-

unreinigt war, wurde von LASSEN (1952) vorgeschlagen, dieses durch Hitzedenaturierung zu zerstören. DEOGNY ET AL. (1975) entfernten Plasminogen durch Adsorption an Bentonit. HAVERKATE und BRAKMAN (1975) schließlich beschrieben industriell hergestelltes plasminogenreiches und plasminogenfreies Fibrinogen, das wissenschaftlichen Ansprüchen zur Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität genügt.

II : F I B R I N O L Y S E

Die Fibrinolyse weist in ihrem biochemischen Aufbau eine erstaunliche Parallelität zum Gerinnungssystem auf. Wie im Gerinnungssystem existiert auch hier ein wirksames Enzym, das PLASMIN.
Es liegt im Plasma in einer inaktiven Vorstufe, dem Plasminogen, vor. Die Plasminogenaktivierung erfolgt durch verschie-



Einfaches Fibrinolyse - Schema (in Anlehnung an J. JAENECKE, 1976)

dene Aktivatoren oder Kinasen, die gewebsständig sein können oder endogen im Blut als Blutaktivatoren auftreten.
Der Gewebsaktivator kann z. B. aus Uterusschleimhaut freigesetzt werden und direkt reagieren.
Die Bildung des Blutaktivators beruht möglicherweise auf einer Komplexbildung zwischen Plasminogen und einer Kinase, die befähigt ist, weiteres Plasminogen in Plasmin umzuwandeln. Der Komplex selber hat keine wesentliche proteolytische Aktivität.
Plasminogen wird in der Leber gebildet. Es ist in der Lage, nach Aktivierung zu Plasmin nicht nur Fibrinogen und Fibrin zu spalten, sondern auch andere Plasmaproteine wie zum Beispiel Gerinnungsfaktoren.

Das fibrinolytische System wird durch Inhibitoren im Gleichgewicht gehalten. Diese sind überwiegend ANTIPLASMINE, die im Blut vorhandenes, freies Plasmin schnell inaktivieren. Es handelt sich dabei um α_1- Antitrypsin, das α_2- Makroglobulin und das Antithrombin III. Insgesamt ist die Antiplasminkapazität im menschlichen Serum etwa 30 mal größer als die potentielle Plasminkapazität.

Wahrscheinlich existiert eine Art Gleichgewicht innerhalb des gesamten Gerinnungssystems, wobei die Fibrinbildung und die Fibrinolyse jeweils aus fördernden und hemmenden Komponenten besteht.

III : P R O B L E M S T E L L U N G

Der spontan und auch therapeutisch induzierte Zellzerfall leukämischer Zellen im Verlauf akuter und chronischer Leukämien führt zur Freisetzung von Substanzen, die sowohl das plasmatische Gerinnungssystem wie auch das fibrinolytische System beeinflussen könnten. So sind Blutungen im Verlauf von Leukämien trotz ausreichender Thrombozytenzahlen nicht ungewöhnlich.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, in vergleichender Untersuchung das fibrinolytische Verhalten normaler und leukämischer Leukozyten zu analysieren. Die Auftrennung gemischter Leukozyten in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten sollte Aufschluß darüber geben, welche dieser Zellfraktionen die stärkste fibrinolytische Aktivität ausübt. Durch die Zugabe von Fibrinolyse- und Proteinaseinhibitoren sollte zwischen einer fibrinolytischen und unspezifisch - proteinolytischen Enzymaktivität unterschieden werden.

IV : MATERIAL UND METHODEN

1a Lösungen zur Leukozytenisolierung

Ronpacon - Dextran - Lösung

Ronpacon "Cilag" 75 % (Cilag Chemie, Alsbach)

Dextran T 500 "Pharmacia" (Fine Uppsala, Schweden)

Herstellung der Lösung :

I) 1 Ampulle Ronpacon^{R} (2o ml 75 %) wird mit Ampuwa auf 45,7 ml, d.h. folgende Werte verdünnt : 32,8 %, Dichte 1,200 $\pm$ 0,001 g/ml, pH = 7,3 $\pm$ 0,3

II) 4,o2 g Dextran T 500 werden in 67 ml Ampuwa aufgelöst; es ergibt sich eine 6 %ige Lösung.

III) Die 67 ml 6 %ige Dextranlösung wird mit 33 ml 32,8 %iger Ronpaconlösung vermischt; es ergeben sich 100 ml Sedimentierflüssigkeit. Die Dichte beträgt nun 1,07 - 1,08 g/ml.

Die Ronpacon - Dextran - Lösung wird bei 4^{o} C aufbewahrt.

Borat / Borsäurepuffer

Natriumtetraborat $Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$ (Merck, Darmstadt)

Borsäure H_3BO_3 (Merck, Darmstadt)

Herstellung des Puffers :

Man mischt 19,1 ml einer 0,05 molaren Natriumtetraboratlösung mit 8o,9 ml einer 0,2 molaren Borsäurelösung und gibt dazu noch 260 mg Natriumchlorid; dies ergibt einen Puffer mit pH 7,7.

3,6 %ige Natriumchloridlösung

1b Lösungen und Reagenzien zur Fibrinplattenherstellung

0,2 %ige Lösung von plasminogenreichem Fibrinogen (Rinderfibrinogen der Behringwerke Marburg, Germany) in Boratpuffer.
0,2 %ige Lösung von plasminogenfreiem Fibrinogen (Poviet, Amsterdam), bezogen auf gerinnungsfähiges Fibrinogen in Boratpuffer
Thrombin (Parke - Davis) mit 100 NIH/ml in physiologischer Kochsalzlösung
Plasminogenfreies Thrombin (Leo, Kopenhagen) mit 100 NIH/ml in physiologischer Kochsalzlösung
0,25 molare Calciumchloridlösung ($CaCl_2 \cdot H_2O$)
$CaCl_2$ - Thrombinlösung für Fibrinplatten :
Man mischt 9 ml der 0,25 molaren $CaCl_2$ - Lösung mit 1 ml der jeweiligen Thrombinlösung

Fibrinolyse - Inhibitoren
1 %ige Sojabohnentrypsininhibitorlösung (S.B.T.I.) in Boratpuffer (Sigma Chemicals, St.Louis, USA)
Trasylol^R (Bayer, Leverkusen)
Anvitoff^R (Knoll AG, Ludwigshafen)

1c Kulturmedium

RPMI 1640 Medium with L-Glutamin (Microbiological Associates, Bethesda, Maryland, USA)

1d Endotoxin

Lipopolysaccharide B from Salmonella enteritidis (Difco, Detroit, Michigan, USA)

1e Trypanblaulösung

1 %ige Lösung von Trypanblau (Bayer, Leverkusen) in Boratpuffer

1f Lösungen zur Proteinbestimmung nach Lowry

2 %ige Natriumcarbonatlösung (Na_2CO_3) in 0,1 molarer Natronlösung
1 %ige Kupfersulfatlösung ($CuSO_4$) in bidest. Wasser
2 %ige Natriumkaliumtartratlösung in bidest. Wasser
Folin-Reagenz (Merck, Darmstadt) 1:3 mit bidest. Wasser verdünnt

Alle zur Herstellung der Lösungen verwendeten Reagenzien waren vom Reinheitsgrad p.a. (pro analysi).

2 Anreicherung der Leukozyten

Die Leukozytenisolierung erfolgte in Anlehnung an BÖYUM (1968). In sterilen Kunststoffröhrchen werden 3 - 4 ml Ronpacon - Dextranlösung vorsichtig mit 10 ml Citratblut überschichtet. Nach 1 bis 1,5 Std hebt man den gelblichen, leukozytenreichen Überstand mit einer sterilen Pipette ab und zentrifugiert 5 min bei 50 - 60 g; der Überstand wird verworfen. Die Leukozyten werden in 1 ml einer 0,9 %igen Kochsalzlösung suspendiert und die noch vorhandenen Erythrozyten durch "Hypotone Hämolyse" entfernt. Dazu läßt man 3 ml bidestilliertes Wasser 30 sec lang einwirken und gibt unmittelbar danach 1 ml 3,6 %ige Natriumchloridlösung dazu. Jetzt ist die Suspension

wieder isoton. Man zentrifugiert und wäscht die Leukozyten 4 mal mit Boratpuffer. Nach jedem Waschgang wird jeweils mit 50 - 60 g über 5 min zentrifugiert. Man resuspendiert die Leukozyten, zählt sie in einer Zählkammer und bringt sie mit Boratpuffer auf die entsprechende Zahl/µl. Nach 4 maligem Waschen befinden sich noch durchschnittlich 10 000 - 20 000 Thrombozyten/µl in der Suspension.

Die Isolierung der Lymphozyten von den Monozyten erfolgte über eine Dichtegradienten - Zentrifugation nach dem von SAAL ET AL. (1976) beschriebenen Verfahren. Dabei werden durch Ficoll/Urovison - Dichtegradientenzentrifugation und Filtration durch Nylonwolle die Lymphozyten von den Monozyten getrennt.
Monozyten werden nach dem Adhärenzverfahren isoliert. Dabei werden Monozyten - Lymphozyten - Gemische in RMPI 1640 Medium in Petrischalen bei 37° C inkubiert, wobei die Monozyten als adhärente Zellen an der Wand der Petrischale verbleiben.
Die Isolierung der Granulozyten erfolgte in Anlehnung an BÖYUM (1968).*

3 Inkubation der Leukozyten

In Gewebekulturflaschen (Falcon Plastics, 50 ml) werden die Leukozyten in einer Konzentration von ca 6 000/µl während 20 Std in 20 ml Kulturmedium bei 37° C inkubiert. Anschließend zentrifugiert man bei 50 - 60 g über 5 min und bestimmt den Proteingehalt nach Lowry im Zentrifugat.

---

* Wir danken Dr. J.G. Saal (Abt. für Exp. Chir. und Immunologie der Chir. Universitätsklinik Tübingen) für die Überlassung der isolierten Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten.

Bei der Inkubation mit Endotoxin wird ebenso verfahren wie oben.
Die Endotoxin - Konzentrationen betrugen 10µg/ml und 100µg/ml Kulturmedium.
Vor der Inkubation wurde die "Viability" der Leukozyten wie folgt bestimmt :
Man inkubiert 30µl der Leukozytensuspension über 30 min bei Zimmertemperatur in 500µl einer 1:5 Verdünnung der Trypanblaustammlösung (1%) in Boratpuffer. Nun zentrifugiert man mit niedriger Drehzahl und zählt in einer Zählkammer 200 Zellen des Zentrifugats aus. Intakte Zellen färben sich während der Inkubation nicht an.
Die "Viability" lag in allen untersuchten Fällen bei 90 - 96 %.

4 Proteinbestimmung nach LOWRY (1951)

Die Proteinbestimmung war notwendig geworden, nachdem sich herausstellte, daß sich die Leukozyten bei der Inkubation teilweise verklumpen und somit in der Zählkammer nicht mehr gezählt werden können. Um zu vergleichbaren Ergebnissen zu kommen, wurde die Leukozytenzahl auch vor der Inkubation mit Hilfe der Methode nach Lowry ermittelt.
Man bestimmt dabei die Extinktion einer Lösung mit einem Spektrometer bei 730 nm und entnimmt aus einer Eichkurve, die mit Albumin erstellt wurde, den Proteingehalt der Lösung.
Um diese Ergebnisse mit denen vor Inkubation vergleichen zu können, wurde eine Beziehung zwischen der Zahl der Leukozyten und die durch ihren Proteingehalt hervorgerufene Extinktion graphisch dargestellt.
Zur Bestimmung des Proteins wurden die Leukozyten mit Ultra-

schall (Branson Sonifier B 12) homogenisiert.

5 Herstellung der Fibrinplatten

Man gibt in Petrischalen (Optilux, Falcon Plastics) 9,5 ml der 0,2 %igen Fibrinogenlösung und mischt unter kreisförmigem Schwenken während 10 sec auf einer ebenen Unterlage 0,5 ml der $CaCl_2$ - Thrombinlösung. Die Fibrinplatte wird 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen, bis die Verfestigung des Fibrins vollendet ist.

Zum plasminogenreichen Fibrinogen wird plasminogenhaltiges $CaCl_2$ - Thrombin gegeben, zum plasminogenfreien Fibrinogen entsprechend das plasminogenfreie $CaCl_2$ - Thrombin.

Die Fibrinplatten können bei 4^o C über 24 Std aufbewahrt werden, ohne daß Unterschiede in der Größe der Lyseflächen auftreten.

Die mit Fibrinolyseinhibitoren versetzten Fibrinplatten werden nach dem gleichen Prinzip hergestellt. Die durch Zugabe von 0,5 ml Trasylol^R bzw. 0,4 ml Anvitoff^R verursachte Verdünnung der Fibrinkonzentration und Zunahme der Fibrinschichtdicke wurde vernachlässigt.

Die Fibrinolyseinhibitoren sind von folgender Konzentration :

Trasylol^R : 25 000 E/Fibrinplatte
Anvitoff^R : 20 mg/Fibrinplatte
S.B.T.I. : 0,5 mg/Fibrinplatte

Die Leukozytensuspension wurde vor dem Auftragen auf die Fibrinplatten mit Ultraschall (Branson Sonifier B 12) 10 sec lang bei 30 Watt unter Eiskühlung homogenisiert.

Aufgetragen wurden jeweils 30 µl der homogenisierten Suspension.

V : E R G E B N I S S E

1a Fibrinolyse gemischter Leukozyten auf plasminogenreichen und plasminogenfreien Fibrinplatten

1) Die Leukozytenhomogenate führen auf plasminogenreichen Fibrinplatten (PRF) und auf plasminogenfreien Fibrinplatten (PFF) zur Lyse des Fibrins (Abb. 1 und 2).

2) Die Größe der Lysehöfe nimmt mit der Zahl der aufgetragenen Leukozyten zu, wobei in der halblogarithmischen Darstellung mit der Zahl der Leukozyten als Ordinate (logarithmisch) gegenüber der erhaltenen Lysefläche als Abszisse (linear) im Bereich zwischen 0 und 40 000 Leukozyten/μl eine lineare Beziehung besteht. Dies trifft, wie auf Abb. 5 (siehe S. 16) ersichtlich, sowohl für PRF wie auch PFF zu.

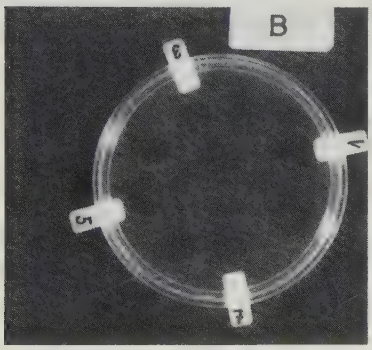


Abb. 1

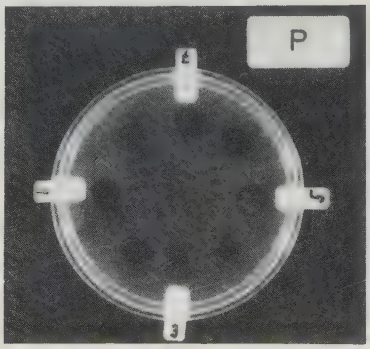


Abb. 2

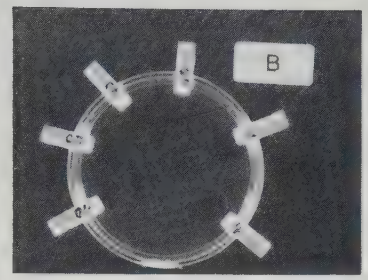
Abb. 1 und 2 : Leukozyten auf plasminogenreichen (PRF, Abb. 1) und auf plasminogenfreien (PFF, Abb. 2) Fibrin platten; Vergrößerung : x 0,7
1,5,7:40 000/μl;2,6,8:20 000/μl;3,4:10 000/μl

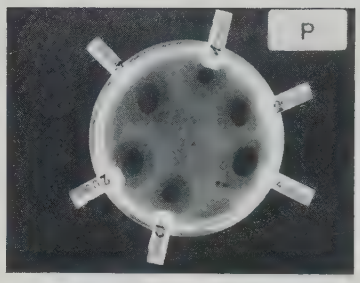
3) Die auf PRF erhaltenen Lysehöfe sind bei einer Konzentration von 40 000 Leukozyten/µl um 60 % größer als die der Leukozyten auf PFF (Tab. 1 und Abb. 6(siehe S. 16)).

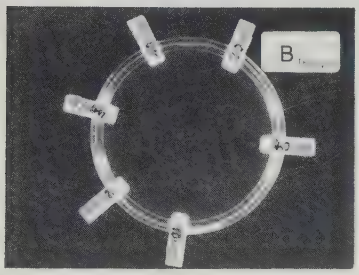
Leukozyten/µl	A (mm^2)	D (mm^2)
40 000	41,4 n = 27 σ = 6,96	26,6 n = 17 σ = 6,15
20 000	26,8 n = 27 σ = 6,92	15,6 n = 15 σ = 4,12
10 000	14,4 n = 8 σ = 4,44	10,9 n = 4 σ = 3,63

Tab. 1 : Größe der Lysehöfe (mm^2) in Abhängigkeit von der aufgetragenen Leukozytenzahl/µl
A = lysierte Fläche auf PRF
D = lysierte Fläche auf PFF

1b Fibrinolyse gemischter Leukozyten nach Zugabe von Antifibrinolytika







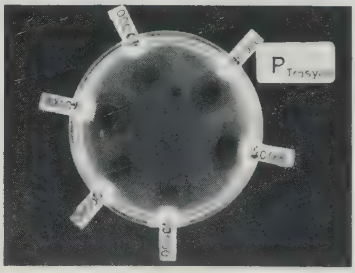


Abb. 3

Abb. 4

Abb. 3 und 4 : Vergleich der Lysehöfe auf PRF (Abb. 3) und PFF (Abb. 4) mit und ohne Zusatz von Trasylol^{R}

1) Die Größe der Lysehöfe auf Fibrinplatten mit Inhibitor ist wie auch bei ungehemmten Fibrinplatten konzentrationsabhängig von der Leukozytenzahl (Abb. 3, 4 und 5).
2) Die Zugabe der Antifibrinolytika auf die Fibrinplatten führt auf PRF zu kleineren Fibrinolysehöfen als auf Platten ohne Antifibrinolytika (Abb. 3, 5 und 6).
3) Auf PFF bestehen keine Größenunterschiede der Lysezonen mit und ohne Inhibitor (Abb. 4, 5 und 6).
4) Die Lysezonen der durch Antifibrinolytika gehemmten PRF

entsprechen der Größe der Lysehöfe von PFF ohne Zusatz eines Inhibitors (Abb. 3, 4 und 6).

5) Es bestehen keine Unterschiede in der Inhibitorwirkung von Trasylol^{R} und Anvitoff^{R} (Tab. 2, Abb. 5 und 6).

6) Sojabohnentrypsininhibitor (S.B.T.I.) unterdrückt die Fibrinolyse auf PRF und PFF vollständig (Abb. 17, siehe S. 32).

In Abb. 5 und 6 **werden die oben auf**geführten Ergebnisse zusammengefaßt.

Abb. 5 veranschaulicht die Beziehung zwischen erhaltener Lysefläche und aufgetragener Leukozytenzahl.

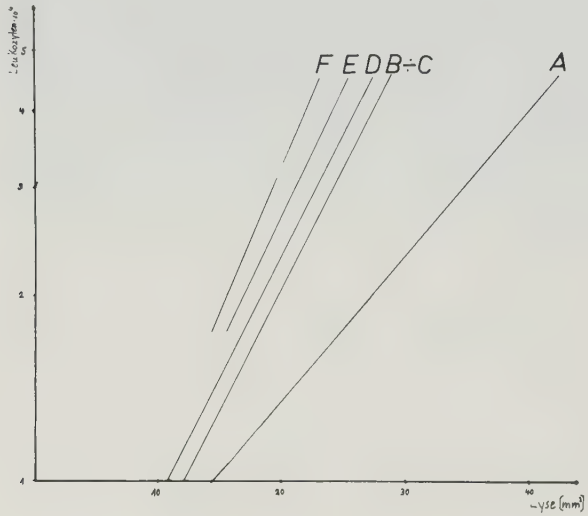


Abb. 5 : Lysefläche (mm^2) in Abhängigkeit von der aufgetragenen Leukozytenzahl in halblogarithmischer Darstellung (Symbole siehe Tab. 1 und 2)

Leukozyten/µl	A (mm^2)	B (mm^2) Trasylol^R	C (mm^2) Anvitoff^R	D (mm^2)	E (mm^2) Trasylol^R	F (mm^2) Anvitoff^R	G (mm^2) S.B.T.I.	H (mm^2) S.B.T.I.
40 000	41,4 n = 27 σ = 6,96	27,7 n = 10 σ = 4,69	27,9 n = 9 σ = 4,62	26,6 n = 17 σ = 6,15	22,1 n = 13 σ = 4,91	24,3 n = 10 σ = 4,31	0 n = 4	0 n = 4
20 000	26,8 n = 27 σ = 6,92	19,2 n = 10 σ = 4,28	19,7 n = 10 σ = 6,74	15,6 n = 15 σ = 4,12	13,9 n = 12 σ = 3,59	15,1 n = 9 σ = 2,75	0 n = 4	0 n = 4
10 000	14,4 n = 8 σ = 4,44	12,5 n = 3 σ = 3,15	12,6 n = 2	10,9 n = 4 σ = 3,63	-	-	-	-

Tab. 2 : Größe der Lysehöfe (mm^2) in Abhängigkeit von der aufgetragenen Leukozytenzahl/µl nach Zusatz der Antifibrinolytika Trasylol^R, Anvitoff^R und S.B.T.I.

A, B, C und G : lysierte Fläche auf PRF

D, E, F und H : lysierte Fläche auf PFF

Abb. 6 dient als Vergleich der lysierten Flächen bei einer Leukozytenzahl von 40 000/µl. Die Symbole entsprechen denen in Tab. 1 und 2. Man erkennt, daß die Lysehöfe auf PRF signifikant größer als auf PFF sind. Keine Unterschiede bestehen zwischen PRF, die durch Antifibrinolytika gehemmt wurden und PFF mit und ohne Zusatz von Antifibrinolytika.

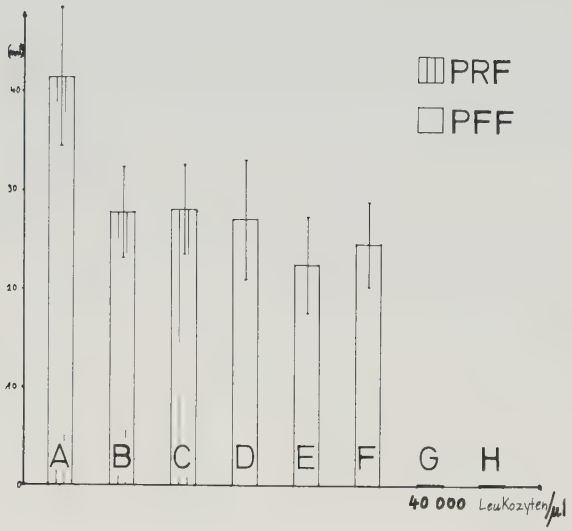


Abb. 6 : Vergleich der Lysehöfe (40 000 Leukozyten/µl) mit und ohne Inhibitoren auf PRF und PFF.

A (n = 27) und D (n = 17) : ohne Inhibitor
B (n = 10) und E (n = 13) : mit Trasylol^{R}
C (n = 9) und F (n = 10) : mit Anvitoff^{R}
G (n = 4) und H (n = 4) : mit S.B.T.I.

2 Fibrinolytische Aktivität gemischter Leukozyten nach Endotoxinstimulierung

Zur Ermittlung des Proteingehaltes einer homogenisierten Leukozytensuspension wurde nach Lowry mit Albumin eine Eichkurve ermittelt (Abb. 7). Diese zeigt die vom Lambert - Beerschen Gesetz geforderte lineare Abhängigkeit zwischen der Extinktion E und der Konzentration des absorbierenden Stoffes.

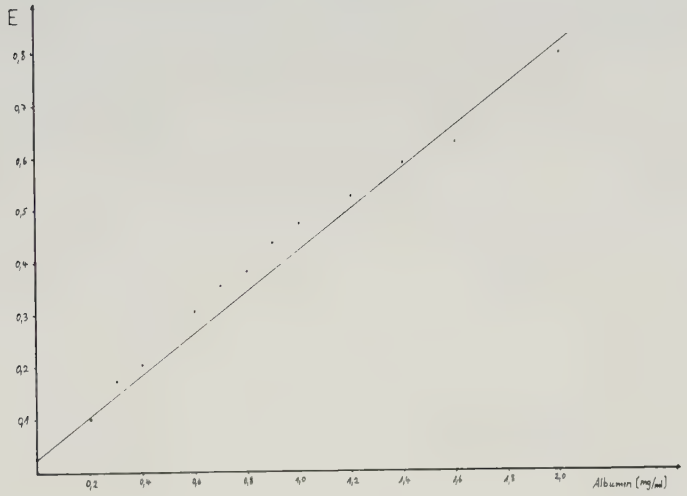


Abb. 7 : Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration (Albumin) und Extinktion E nach Lowry.

Abb. 8 zeigt die Beziehung zwischen Leukozytenzahl und die durch den Proteingehalt der Leukozyten hervorgerufene Extinktion E. Auch hier gilt das Lambert - Beer´sche Gesetz.

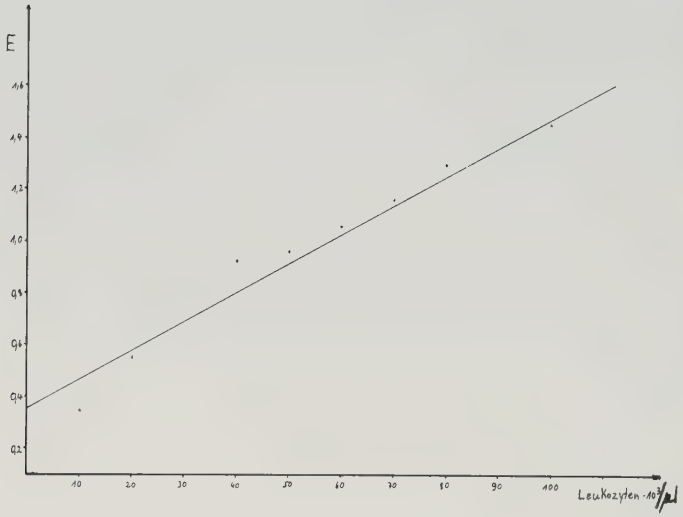


Abb. 8 : Zusammenhang zwischen Leukozytenzahl und Extinktion E nach Lowry.

1) Auf PRF aufgetragene Leukozyten, die mit 100 µg/ml Endotoxin über 2 Std bei 37° C inkubiert wurden, führen zu Lysehöfen, die annähernd 3 mal so groß sind wie die von Leukozyten ohne Inkubation (Tab. 3 und Abb. 9).
2) Die Größe der Lysehöfe steht in Abhängigkeit von der Konzentration der Leukozyten und entspricht somit den Befunden nicht Endotoxin - stimulierter Leukozyten (Abb. 9).

Protein (mg/ml)	2,7	2,25	1,6	1,31	1,0
Leukos/µl	70 000	50 000	30 000	20 000	10 000
A	116,1 n = 3 σ = 20,37	73,3 n = 3 σ = 7,54	63,6 n = 4 σ = 8,66	-	23,5 n = 6 σ = 5,03
B	-	200,1 n = 2	167,8 n = 2	103,3 n = 4 σ = 6,24	70,9 n = 7 σ = 7,33

Tab. 3 : Lysehöfe (mm^2) Endotoxin - stimulierter (B) und nicht inkubierter Leukozyten (A) auf PRF in Abhängigkeit von der aufgetragenen Leukozytenzahl.

Abb. 9 veranschaulicht in der halblogarithmischen Darstellung die lineare Beziehung zwischen aufgetragener Leukozytenzahl (logarithmisch) und der durch sie hervorgerufenen Lysezone (linear) nach Endotoxinstimulierung (B) und Normalleukozyten (A).

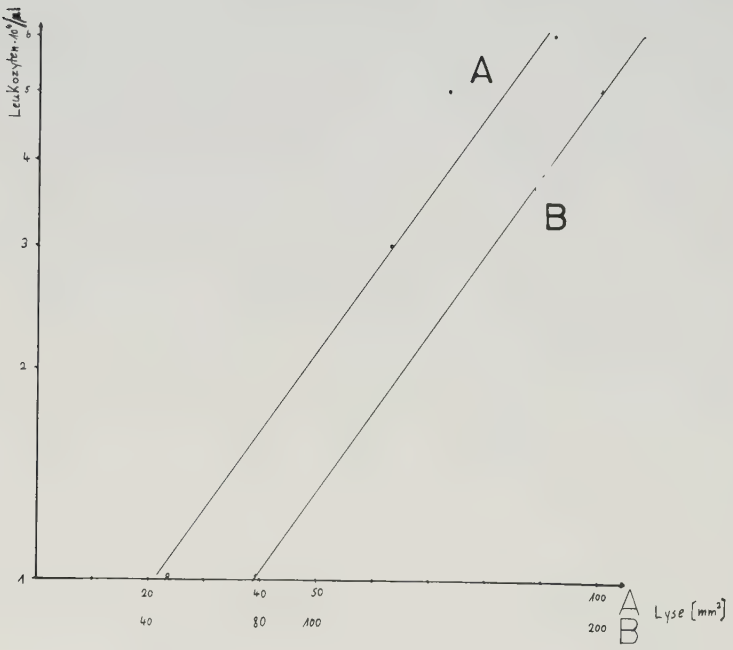


Abb. 9 : Vergleich der Lysehöfe (mm^2) von Endotoxin - stimulierten (B) und von nicht Endotoxin - stimulierten nicht inkubierten Leukozyten (A) auf PRF in Abhängigkeit von der aufgetragenen Zahl.

Abb. 10 faßt vergleichend die Untersuchungsergebnisse bei 25 000 Leukozyten/µl von nicht inkubierten, inkubierten, inkubierten und Endotoxin - stimulierten Leukozyten zusammen. Man erkennt, daß die Endotoxinstimulierung zu einer stark vermehrten Lyse der Fibrinplatten führt.
Endotoxinkonzentrationen von 10µg/ml und 100µg/ml führen zu gleichartigen Ergebnissen.

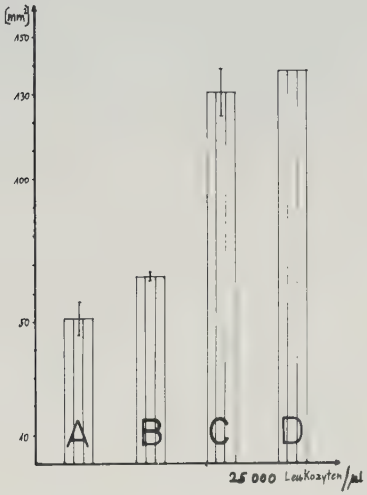


Abb. 10 : Vergleich der Lysehöfe von Leukozyten (25 000/µl) auf PRF unter verschiedenen Bedingungen
A (n = 4) : L. ohne Inkubation
B (n = 3) : L., inkubiert ohne Endotoxin
C (n = 3) : L., inkubiert mit Endotoxin (10µg/ml)
D (n = 2) : L., inkubiert mit Endotoxin (100µg/ml)

3a Fibrinolytische Aktivität von isolierten Granulozyten auf plasminogenreichen und plasminogenfreien Fibrinplatten

1) Reine Granulozytenhomogenate führen auf PRF zu 3 mal so großen Lysehöfen wie die auf PFF aufgetragenen Granulozyten (Tab. 5 und Abb. 11).
2) Nach Zusatz des Plasmininhibitors Trasylol^{R} erhält man auf PRF Lysehöfe, die mit denen auf PFF vergleichbar sind (Tab. 5 und Abb. 11).
3) Versetzt man PFF mit Trasylol^{R}, so ergibt sich keine Veränderung der Lysehöfe gegenüber den PFF ohne Inhibitor.
4) Mit S.B.T.I. versetzte Fibrinplatten werden auch durch hohe Zellkonzentrationen nicht lysiert.

Granulozyten/µl	A (mm^2)	B (mm^2) Trasylol^{R}	C (mm^2)	D (mm^2) Trasylol^{R}
40 000	95,8 n = 3 σ = 13,58	41,5 n = 2	33,4 n = 4 σ = 5,12	36,4 n = 4 σ = 7,1
20 000	50,8 n = 5 σ = 6,81	23,6 n = 3 σ = 7,38	22,4 n = 4 σ = 3,09	24,0 n = 4 σ = 5,02

Tab. 5 : Lysehöfe (mm^2) isolierter Granulozyten auf PRF und PFF in Abhängigkeit von der aufgetragenen Zahl/µl
A und B : lysierte Fläche auf PRF
C und D : lysierte Fläche auf PFF

Abb. 11 veranschaulicht die Abhängigkeit der Größe der Lysehöfe von der aufgetragenen Zellzahl/µl. Die Symbole entsprechen denen in Tab. 5. Man erkennt deutlich die signifikant größere Lyse auf PRF im Vergleich zu PFF.

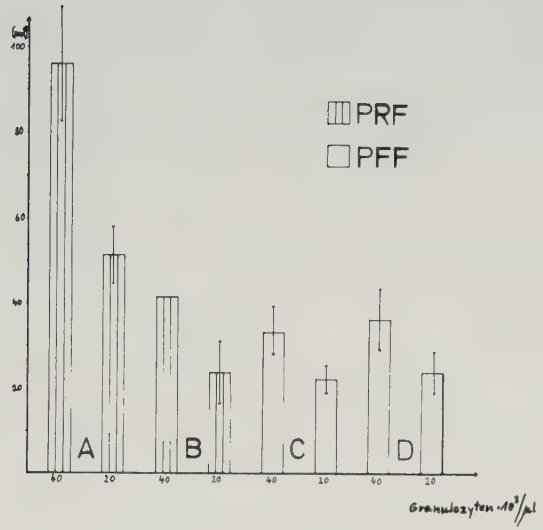


Abb. 11 : Vergleich der Lysehöfe (mm^2) isolierter Granulozyten auf PRF und PFF mit und ohne Zusatz von Trasylol^R

A und C : PRF und PFF ohne Zusatz von Trasylol^R

B und D : PRF und PFF mit Zusatz von Trasylol^R

3b Fibrinolytische Aktivität von isolierten Monozyten auf plasminogenreichen und plasminogenfreien Fibrinplatten

1) Monozyten führen erst in sehr hohen Zellkonzentrationen zu einer sehr kleinen Lysezone, die sich auf PRF und PFF nicht unterscheidet (Tab. 8 und Abb. 12).
2) Eine messbare Lyse kommt unter 40 000 Monozyten/µl nicht zustande.
3) Eine Beeinflußung der Lysezonen durch Antifibrinolytika wie Trasylol^{R} oder Anvitoff^{R} ist nicht festzustellen.
4) Nach Zugabe von S.B.T.I. erhält man auch bei höchsten Monozytenkonzentrationen keine Lyse.

Monozyten/µl	A (mm^2)	B (mm^2)
100 000	13,6 n = 3 σ = 1,05	15,0 n = 3 σ = 2,94
40 000	9,64 n = 3 σ = 4,8	8,85 n = 4 σ = 5,16

Tab. 6 : Lysehöfe (mm^2) isolierter Monozyten auf PRF und PFF in Abhängigkeit von der aufgetragenen Zellzahl/µl
A : lysierte Fläche auf PRF
B : lysierte Fläche auf PFF

3c Fibrinolytische Aktivität isolierter Lymphozyten auf plasminogenreichen und plasminogenfreien Fibrinplatten

1) Lymphozyten führen weder auf PRF noch auf PFF zu einer Lyse, selbst nicht bei einer Lymphozytenkonzentration von 1oo ooo/µl; n = 4 (Abb. 12 und Tab. 7)

Tab. 7 und Abb. 12 dienen dem Vergleich der Lysewirkung von isolierten Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Die Symbole in Abb. 12 entsprechen denen der Tab. 7. Man erkennt, daß Granulozyten zu einer beträchtlichen Lyse, Monozyten zu einer sehr geringen und Lymphozyten zu keiner Lyse befähigt sind.

	Granulozyten		Monozyten		Lymphozyten	
Zellen/µl	A (mm^2)	B (mm^2)	C (mm^2)	D (mm^2)	E (mm^2)	F (mm^2)
100 000	-	-	13,6 n = 3 σ = 1,05	15,0 n = 3 σ = 2,94	0 n = 4	0 n = 4
40 000	95,8 n = 3 σ = 13,58	33,4 n = 4 σ = 5,12	9,46 n = 4 σ = 4,8	8,85 n = 4 σ = 5,16	0 n = 4	0 n = 4

Tab. 7 : Lysehöfe (mm^2) isolierter Fraktionen der Leukozyten auf PRF und PFF in Abhängigkeit von der aufgetragenen Zahl/µl
A, C und E : lysierte Fläche auf PRF
B, D und F : lysierte Fläche auf PFF

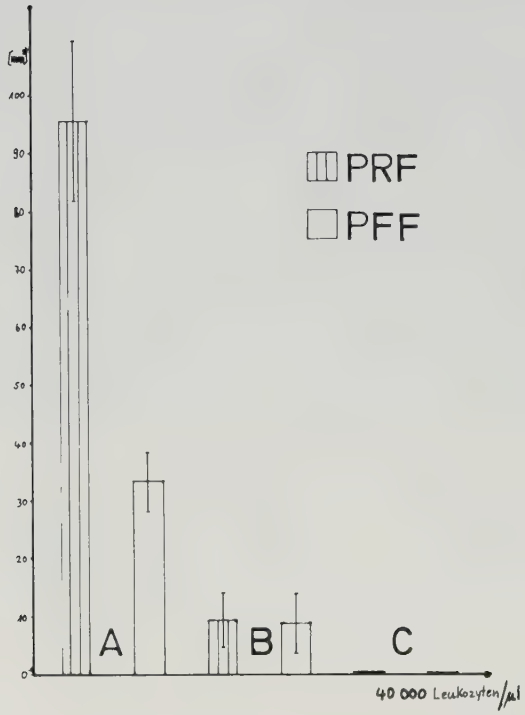


Abb. 12 : Lysehöfe (mm^2) der isolierten Zellfraktionen auf PRF und PFF (40 000 Zellen/μl)

A : Granulozyten auf PRF und PFF

B : Monozyten auf PRF und PFF

C : Lymphozyten auf PRF und PFF

4 Fibrinolytische Aktivität von Myeloblasten bei akuter Leukämie (Blastenanteil >80 %)

1) Leukozyten von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie führen auf PRF und PFF in allen untersuchten Fällen (n = 10) zu keiner Fibrinolyse (Abb. 15, 16 und 18).
2) Die beobachteten Aufhellungszonen sind wahrscheinlich auf die Diffusion des Homogenats in den Fibrinfilm und die damit verbundene Auflockerung des Fibringerüstes zurückzuführen.
3) Die Leukozyten einer Patientin mit akuter lymphatischer Leukämie führen auf PRF und PFF zu keiner Fibrinolyse.

5 Fibrinolytische Aktivität von Lymphoblasten und Lymphozyten bei chronisch lymphatischer Leukämie (lymphozytäre Zellen >90 %)

1) Die Leukozyten von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie führen auf PRF und PFF zu keiner Fibrinolyse; n = 9 (Abb. 18).
2) In drei Fällen, bei denen 100 000 Zellen/µl aufgetragen wurden, konnte ebenfalls keine Fibrinolyse beobachtet werden.

6 Fibrinolytische Aktivität von Leukozyten von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (granulozytäre Zellen >90 %)

1) Leukozytenhomogenate führen auf PRF und PFF zu sehr großen Lysezonen, die konzentrationsabhängig von der Leukozytenzahl sind (Abb. 13, 14, 15 und 16 sowie Tab. 7).
2) Die auf PRF erhaltenen Lysezonen sind um 50 % größer als die auf PFF (Abb. 13, 14 und Tab. 7).

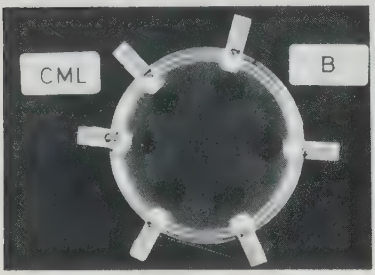


Abb. 13

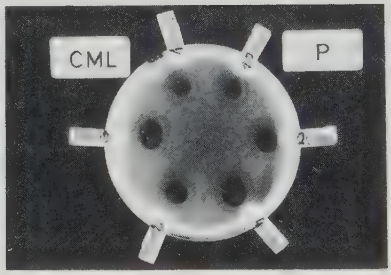


Abb. 14

Abb. 13 : Fibrinolyse von Leukozyten bei chronisch myeloischer Leukämie (CML) auf PRF; Vergrößerung x 0,5

Abb. 14 : Fibrinolyse von Leukozyten bei CML auf PFF; Vergrößerung x 0,5

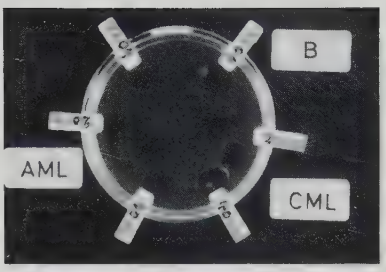
3) Die Größe der Lysehöfe auf Fibrinplatten mit Inhibitor ist wie auch bei ungehemmten Fibrinplatten konzentrationsabhängig von der Leukozytenzahl (Abb. 15, 16 und Tab. 7).
4) Die Zugabe der Antifibrinolytika auf die Fibrinplatten führt auf PRF zu kleineren Fibrinolysehöfen als auf Platten ohne Antifibrinolytika (Abb. 15).
5) Auf PFF bestehen keine Größenunterschiede in den Lysezonen mit und ohne Inhibitor (Abb. 16).

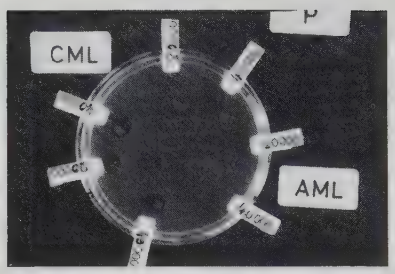
Zellen/µl	A (mm^2)	B (mm^2) Trasylol®	C (mm^2) Anvitoff®	D (mm^2)	E (mm^2) Trasylol®	F (mm^2) Anvitoff®
40 000	126,8 n = 5 σ = 11,75	88,6 n = 3 σ = 9,61	103,6 n = 4 σ = 8,70	84,3 n = 5 σ = 9,51	79,6 n = 5 σ = 5,58	74,5 n = 3 σ = 14,15
20 000	87,9 n = 5 σ = 9,36	62,2 n = 3 σ = 17,85	74,7 n = 4 σ = 11,75	57,7 n = 5 σ = 6,49	50,3 n = 5 σ = 5,98	53,0 n = 3 σ = 11,7
10 000	51,6 n = 2	-	-	33,1 n = 4 σ = 5,33	-	-

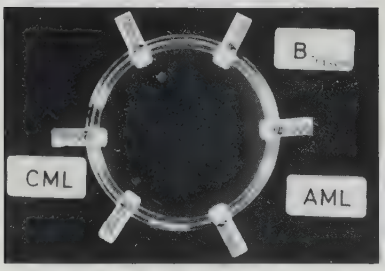
Tab. 7 : Lysehöfe (mm^2) von Leukozyten bei chronisch myeloischer Leukämie in Abhängigkeit von ihrer Zahl/µl auf PRF und PFF

A, B und C : lysierte Fläche auf PRF

D, E und F : lysierte Fläche auf PFF







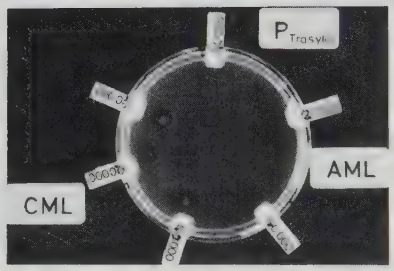


Abb. 15 Abb. 16

Abb. 15 und 16 : Fibrinolyse auf PRF (Abb. 15) und PFF (Abb. 16) von CML - Leukozyten und AML - Leukozyten mit und ohne Trasylol^{R};Vergrößerung x 0,5

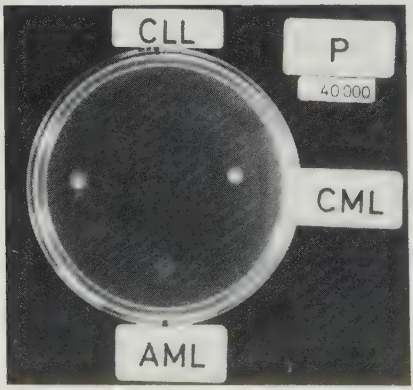


Abb. 17 : Fehlende Fibrinolyse auf PFF mit Zusatz von S.B.T.I Links im Bild gemischte Leukozyten einer Kontrollperson; Vergrößerung x 0,7

6) Die Lysezonen der durch Antifibrinolytika gehemmten PRF entsprechen der Größe der Lysehöfe von PFF ohne Zusatz eines Inhibitors (Abb. 15 und 16).

7) Nach Zusatz von S.B.T.I. zu PFF wurde in keinem Fall eine Lyse beobachtet (Abb. 17).

Abb. 18 zeigt vergleichend die fibrinolytische Wirksamkeit von Leukozytenhomogenaten verschiedener Leukämiezellen und von Leukozyten von Gesunden.

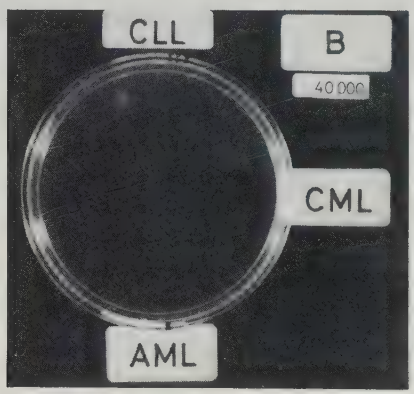


Abb. 18 : Fibrinolyse von Leukozyten (40 000/µl) Kranker mit AML, CLL, CML und Gesunder (links im Bild) auf PRF. Bei AML und CLL lediglich Aufhellungszonen, keine Fibrinolyse. Vergrößerung x 0,7

VI : D I S K U S S I O N

Zur Lyse extra- oder intravasaler Gerinnsel stehen dem Organismus zwei Mechanismen zur Verfügung : eine "unspezifisch - proteolytische" und eine "spezifisch - plasminbedingte" Fibrinolyse. Während die "unspezifische" Fibrinolyse keiner Aktivatoren bedarf, wird die "spezifische" über eine Aktivierung des Plasminogens ausgelöst.

Bei allen Untersuchern besteht Übereinstimmung, daß Leukozyten eine "unspezifische", im neutralen pH wirksame Protease enthalten (OPIE 1907 ; HUSFELDT 1931 ; FRÄNKEL - CONRATH und CHEW 1960 ; MOUNTER und ATIYEH 1960 ; CAVIEZEL, VOLLERY und VANOTTI 1964 ; MIESCHER 1965). ASTRUP ET AL.(1967) , sowie BLEYL und NAGEL (1968) lehnen die Existenz einer leukozytären "spezifischen", das Plasminogen aktivierende Protease ab.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen stehen in Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (BACIU 1965 ; SABA ET AL. 1969 sowie KOPITAR und STEGNAR 1974), daß Leukozyten sowohl mittels einer "unspezifischen" Protease wie auch über die "spezifische" Plasminogenaktivierung zur Lyse von Fibrin befähigt sind.

Die "spezifisch - plasminbedingte" Wirkung wurde auf plasminogenreichen Fibrinplatten nachgewiesen. Auf diesen Fibrinplatten entfaltet der in den Leukozyten postulierte Plasminogenaktivator über eine Aktivierung des Plasminogens zu Plasmin eine spezifische fibrinolytische Wirkung, während auf plasminogenfreien Fibrinplatten allein die "unspezifische - proteinolytische" Wirkung die Fibrinolyse hervorruft. Nach Zugabe von Antifibrinolytika erhielt man auf plasminogenreichen Fibrin-

platten kleinere Lysehöfe, die mit denen auf plasminogenfreien Fibrinplatten vergleichbar waren. Diese Lysehemmung beweist die Existenz eines Plasminogenaktivators in Leukozyten. ASTRUP ET AL. (1967), die eine leukozytäre Plasminogenaktivatoraktivität ablehnen, fanden zwar ebenso wie GANS (1963) einen quantitativen Unterschied zwischen plasminogenhaltigen Astrup - Fibrinplatten und hitzeinaktivierten, plasminogenfreien Fibrinplatten nach LASSEN (1952), führten diesen aber auf die von LASSEN beschriebene herabgesetzte Empfindlichkeit hitzedenaturierter Fibrinplatten gegenüber proteolytischem Angriff zurück. Diese Überlegung trifft für das zwischenzeitlich industriell hergestellte plasminogenfreie Fibrinogen aber nicht mehr zu, so daß aus den hier erhaltenen Ergebnissen tatsächlich auf einen Plasminogenaktivator geschlossen werden muß.

Unsere Untersuchungen ergaben keinen Anhalt dafür, daß Leukozyten neben Plasminogen - Aktivator auch Plasminogen enthalten, da die Größe der Fibrinolysezonen auf plasminogenfreien Fibrinplatten denen auf plasminogenreichen nach Zusatz eines Fibrinolyseinhibitors entsprachen. OHLSSON (1971) bestätigte dies für polymorphkernige Leukozyten aufgrund von Gelfiltration, Agarose - Gel - Elektrophorese und auf immunchemischem Weg. BARNHARDT und RIDDLE (1965) dagegen vermuteten, daß in Eosinophilen Plasminogen synthetisiert wird. Auch MITSUOKA ET AL. (1969) postulierten die Existenz von Plasminogen in Leukozyten nach der Astrup - Fibrinplatten - Methode.

Nach Trennung der Leukozyten in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten zeigte sich, daß die Fibrinolyse von den Granulozyten ausgeht, während Lymphozyten keinerlei Aktivität zeigten. Monozyten waren nur in sehr hoher Konzentration zu einer angedeuteten Lyse des Fibrins befähigt. Auch STORMORKEN (1966)

konnte in Lymphozyten keine fibrinolytische Aktivität nachweisen. Untersuchungen anderer Autoren über fibrinolytische Aktivitäten menschlicher Monozyten liegen bisher nicht vor.

Eine höhere fibrinolytische Aktivität ging dann von Leukozyten aus, wenn sie zuvor über zwei Stunden in einem Kulturmedium suspendiert und gleichzeitig mit Endotoxin stimuliert wurden. Dies wurde auch von GOLDSTEIN ET AL. (1971) in einer allerdings andersartigen Versuchsanordnung bestätigt. Da nur auf plasminogenreichen Fibrinplatten eine verstärkte Lyse zu erkennen war, muß die Endotoxinwirkung auf einer Steigerung des Plasminogenaktivators beruhen.
Für die vermehrte fibrinolytische Aktivität von Leukozyten nach Endotoxinstimulierung findet sich eine interessante Parallele im plasmatischen Gerinnungssystem. Es wurde von mehreren Untersuchern eine vermehrte Freisetzung gerinnungsaktiven Materials nach Stimulierung mit Endotoxin beschrieben (LERNER ET AL. 1971, NIEMETZ 1972, HILLER ET AL. 1976).

Leukämische weiße Blutzellen zeigten ein sehr unterschiedliches fibrinolytisches Verhalten. So konnte weder in Myeloblasten von Kranken mit akuten Leukämien noch in den Lymphozyten Kranker mit chronischer lymphatischer Leukämie eine fibrinolytische Aktivität nachgewiesen werden. Ähnliche Befunde wurden von WATANABE (1970) erhoben. Dagegen führten Leukozyten von Kranken mit chronisch myeloischer Leukämie zu einer sehr hohen, ausgereifte normale Granulozyten übertreffende Fibrinolyse. Dies stünde in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von PROKOPOWICZ und STORMORKEN (1968), die auf Grund zytochemischer Untersuchungen annahmen, daß die höchste fibrinolytische Aktivität der Leukozyten in Metamyelozyten und Stabkernigen zu finden ist. Diese Reifungsstufen machen einen besonders

hohen Anteil der Zellen bei der chronisch myeloischen Leukämie aus. Interessant wäre die Untersuchung von Promyelozyten bei Promyelozytenleukämie gewesen, da diese Erkrankung fast ausnahmslos durch schwere haemorrhagische Diathesen kompliziert ist und sowohl GRALNICK und ABRELL (1973) wie auch WATANABE (1970) eine erhöhte fibrinolytische Aktivität in isolierten Promyelozyten nachweisen konnten. Leider standen im Untersuchungszeitraum keine Zellen von Kranken mit Promyelozytenleukämie zur Verfügung.

Die Blutungskomplikationen bei akuten myeloischen Leukämien sind somit wahrscheinlich nicht auf eine fibrinolytische Aktivität der Myeloblasten zurückzuführen, da sich weder durch unsere Zellpräperationen noch durch die von WATANABE (1970) in vitro eine Fibrinolyse auslösen ließ. Im Gegensatz dazu glaubten MITSUOKA ET AL. (1969) auf Grund der Verkürzung von Euglobulin - Lyse - Zeit und Verlängerung der Thrombinzeit nach Zugabe von Myeloblasten Rückschlüsse auf eine vermehrte Fibrinolyseaktivität ziehen zu können.

Thrombozytopenie, Störungen der Thrombozytenfunktion sowie Verbrauchsreaktion (HEY und LASCH 1972) spielen sicherlich bei der Auslösung der Blutungskomplikationen im Verlauf akuter Leukämien die führende Rolle.

VII : Z U S A M M E N F A S S U N G

Leukozyten von Gesunden und Patienten mit akuten und chronischen Leukämien wurden nach der Methode von BÖYUM isoliert, mehrfach gewaschen, mit Ultraschall homogenisiert und unter verschiedenen Bedingungen auf Fibrinplatten aufgetragen. Hierbei ergaben sich folgende Befunde :

1) Leukozyten enthalten neben einer "unspezifischen" Protease, die im neutralen pH wirksam ist, einen "spezifischen" Plasminogenaktivator, der über die Bildung von Plasmin zur Fibrinolyse führt.
2) Der Plasminogenaktivator war durch Zusatz der Antifibrinolytika Trasylol^{R} und Anvitoff^{R} hemmbar, Plasminogenaktivator und Protease waren durch Zusatz von Sojabohnentrypsininhibitor (S.B.T.I.) gleichermaßen völlig gehemmt.
3) Die fibrinolytische Wirkung geht von den ausdifferenzierten Granulozyten aus, während Lymphozyten und Monozyten unter gleichen Versuchsbedingungen zu keiner fibrinolytischen Aktivität befähigt waren.
4) Leukozyten, die in einem Kulturmedium mit Endotoxin inkubiert wurden, entfalteten eine höhere Plasminogenaktivatoraktivität als nicht stimulierte Zellen. Die Proteasenwirkung wurde nicht beeinflußt.
5) Myeloblasten von Kranken mit akuten Leukämien und Lymphozyten von Kranken mit chronisch lymphatischer Leukämie entfalteten keine fibrinolytische Aktivität. Hingegen ging von den Leukozyten Kranker mit chronisch myeloischer Leukämie die höchste Aktivität aller untersuchter Zellpräperationen aus. Dies ist wahrscheinlich auf den hohen Anteil von Stabkernigen und jugendlichen Granulozyten zurückzuführen.

VIII : L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ASTRUP, T., J. HENRICHSEN und H.C. KWAAN :
Protease content and fibrinolytic avtivity of human leukocytes
Blood 29, 134 - 138 (1967)
2. ASTRUP, T. und S. MULLERTZ :
The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity
Arch. of Biochem. and Biophys. 40, 346 - 351 (1952)
3. BACIU, J. und A. SUCIU :
L´activite´ fibrinolytique des extracts protéiques leukocytaires et de stroma globulaire
Rev. Roum. Physiol. 2, 243 - 248 (1965)
4. BARNES, J.M. :
The enzymes of lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes
J. Exp. Path. 21, 264 (1940)
5. BARNHARDT, M.J. und J.M. RIDDLE :
Cellular localization of profibrinolysin (plasminogen)
Blood 21, 306 - 321 (1963)
6. BLEYL, U. und W. NAGEL :
Untersuchungen zur leukozytären Fibrinolyse
Klin. Wschr. 46, 413 - 417 (1968)
7. BÖYUM, A. :
Isolation of leukocytes from human blood. Further observation
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97, 31 - 50 (1968)
8. BÖYUM, A. :
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97, 77 - 89 (1968)

9. CAVIEZEL, O., M. VOLLERY und A. VANOTTI :
Fibrinolyse leukocytaire
Schweiz. Med. Wschr. 29, 1016 - 1020 (1964)

10. COHN, Z.A. und J.G. HIRSCH :
The isolation and properties of the spezific cytoplasmatic granules of rabbit polymorphonuclear leukocytes
J. Exp. Med. 112, 983 - 1004 (1960)

11. DEOGNY, L., A. WEIDENBACH und J.W. HAMPTON :
Improved fibrin plate method for fibrinolytic activity measurements : Use of bentonite precipitation and agar solidification
Clin. Chim. Acta 60, 85 - 89 (1975)

12. FRAENKEL - CONRAT, J. und W.B. CHEW :
Catheptic activity of leukocytes in normal and leukemic subjects
Blood 16, 1447 - 1455 (1960)

13. GANS, H. :
Fibrinolytic properties of proteases derived from human, dog and rabbit leukocytes
Thromb. Haemostas. 10, 379 - 389 (1963)

14. GOLDSTEIN, I.M., B. WÜNSCHMANN, T. ASTRUP und E.S, HENDERSON :
Effects of bacterial endotoxin on the fibrinolytic activity of normal human leukocytes
Blood 37, 447 - 453 (1971)

15. GRALNICK, H.R. und E. ABRELL :
Studies of the procoagulant and fibrinolytic activity of promyelocytes in acute promyelocytic leukaemia
Br. J. Haematol. 24, 89 - 99 (1973)

16. HAVERKATE, F. und P. BRAKMAN :
The fibrin plate assay - Some crucial conditions
Thromb. Haemostas. 33, 312 - 313 (1975)

17.HERMANN, G. und P.A. MIESCHER :
Differentiation of leukocytic fibrinolytic enzymes from plasmin by the use of plasmatic proteolytic inhibitors
Int. Arch. Allergy, Appl. Immunol. 27, 346 - 354 (1965)

18.HEY, D. und H.G. LASCH :
Koagulopathien bei Leukosen
In : Gross, R., J. Van de Loo : Leukämie; Berlin, Heidelberg, New York : Springer 1972, 437 - 442

19.HILLER, E., H.J. SCHMID, P. OSTENDORF und G.W. GRIFFITHS :
Der Einfluß von Endotoxin auf die Gerinnungsaktivität von Leukozyten
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 82, 1632 - 1635 (1976)

20.HIRSCH, J., J.G. BUCHANAN, G.C. DEGRUCHY und A.G. BAIKIE :
Hypofibrinogenaemia without increased fibrinolysis in leukaemia
Lancet I, 418 - 420 (1967)

21.HUSFELDT, E. :
Proteolytische Enzyme in den Leukozyten des Menschen
Physiol. Chem. 194, 137 (1931)

22.JAENECKE, J. :
Antikoagulatien- und Fibrinolysetherapie
2. Auflage Stuttgart : Thieme 1976, 7 - 9

23.JÜRGENS, J. :
Das Verhalten des fibrinolytischen Systems bei der Leukämie
Folia haemat. 8, 52 - 72 (1963)

24.LASSEN, M. :
Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method
Acta Physiol. Scand. 27, 371 - 376 (1952)

25.LERNER, R.G., R. GOLDSTEIN und G. CUMMINGS :
Stimulation of human leukocyte thromboplastic activity by endotoxin
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 145 - 148 (1971)

26. LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL :
Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

27. MATSUOKA, M., N. SAKURAGAWA und M. SHIMAOKA :
Studies on fibrinolytic activities in normal human leukocytes
Acta Med. Biol. 16, 91 - 104 (1969)

28. MATSUOKA, M., N. SAKURAGAWA und M. SHIMAOKA :
Studies on fibrinolytic activities in pathologic cells of various types of leukaemia
Acta Med. Biol. 17, 251 - 257 (1970)

29. MOUNTER, L.A. und W. ATIYEH :
Proteases of human leukocytes
Blood 15, 52 - 59 (1960)

30. NIEMETZ, J. :
Coagulant activity of leukocytes. Tissue factor activity
J. Clin. Invest. 51, 307 - 313 (1972)

31. OHLSSON, K. :
Properties of leukocytic protease
Clin. Chim. Acta 32, 399 - 405 (1971)

32. OPIE, E.L. :
Experimental pleurisy - Resolution of a fibrinous exudate
J. Exp. Med. 9, 391 - 427 (1907)

33. PROKOPOWICZ, J. und H. STORMORKEN :
Fibrinolytic activity of leukocytes in smears of bone marrow and peripheral blood
Scand. J. Haematol. 5, 129 - 137 (1968)

34. RIDDLE, J.M. und M.J. BARNHARDT :
The eosinophil as a source for profibrinolysin in acute inflammation
Blood 25, 776 - 794 (1965)

35. SAAL, J.G., E.P. RIEBER und G. RIETHMÜLLER :
Cell - mediated cytotoxicity for melanoma tumor cells : Detection by a (^{3}H) proline release assay
Scand. J. Immunol. 8, 455 - 466 (1976)

36. SABA, H.J., J.C. HERION und H.R. ROBERTS :
The effect of lysosomal cationic proteins from granulocytes on the coagulation and fibrinolytic system
Blood 34, 835 (1969)

37. STEGNAR, M., M. KOPITAR, B. ACCHETTO und D. LEBEZ :
Fibrin plate studies of plasminogen activator and inhibitor from pig leukocytes
Thromb. Haemostas. 34, 339 (1975)

38. TODD, A.S. :
Histological localization of fibrinolysin activator
J. Path. Bact. 78, 281 - 283(1959)

39. WATANABE, K. :
Fibrinolytic activity of leukaemic cells
Keio J. Med. 19, 47 - 59 (1970)

40. YOUNG, J.E. und M.D. PRAGER :
Some hydrolytic enzymes in normal and leukaemic human leukocytes
J. Lab. Clin.Med. 60, 385 - 395 (1962)

LEBENSLAUF

Am 19. September 1945 wurde ich, Gerhard MAIER, als Sohn des Technikers Karl MAIER und seiner Frau Helene MAIER, geb. Schaal in Stetten im Remstal geboren.

1952 wurde ich in Miedelsbach eingeschult und absolvierte am Gymnasium in Schorndorf am 26. Februar 1965 das Abitur.

Nach einer zweijährigen Bundeswehrzeit begann ich im Sommersemester 1967 an der Technischen Hochschule in Stuttgart das Studium der Chemie, welches ich im Wintersemester 1971 als Diplomchemiker abschloß.

Im Wintersemester 1972 begann ich an der Universität Hohenheim das Studium der Medizin.

Seit dem Sommersemester 1973 studierte ich Medizin an der Universität Tübingen und bestand 1974 das Physikum.

Am 26. April 1978 habe ich mit dem mündlichen Teil des Dritten Abschnittes nach der Approbationsordnung das Staatsexamen abgelegt.